

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 9 月 2 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 6
Application Number:
ST. 10/C] : [J P 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 6]

願 人
Applicant(s):

独立行政法人 科学技術振興機構
独立行政法人国立環境研究所

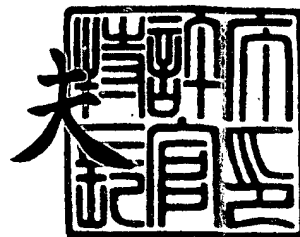
BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 12-471

【提出日】 平成13年 9月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61L 27/00
C12N 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3 - 1 0 8 - 4 0 4

【氏名】 持立 克身

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 基底膜標品の作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することを特徴とする基底膜標品の作製方法。

【請求項 2】 脂質溶解能を有する溶媒を用いて脱脂処理をした後、又は脱脂処理と同時にアルカリ溶液を用いて除タンパク・除核処理をすることを特徴とする請求項 1 記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 3】 脂質溶解能を有する溶媒が界面活性剤であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 4】 界面活性剤がトリトン X-100 (Triton X-100) であることを特徴とする請求項 3 記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 5】 アルカリ溶液が pH 9 ~ 10 のアルカリ溶液であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 6】 さらにプロテアーゼ阻害剤を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 7】 基底膜が、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 8】 基底膜が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の基底膜標品の作製方法。

【請求項 9】 請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の基底膜標品の作製方法により得られることを特徴とする基底膜標品。

【請求項 10】 支持体から遊離状態にあることを特徴とする請求項 9 記載の基底膜標品。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を持った細胞外マトリックスである基底膜の標品を作製する方法や、かかる作製方法により得られる基底膜標品に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

動物の体の内外の表面を覆っている細胞層である表皮、角膜上皮、肺胞上皮、消化器系の粘膜上皮、腎臓子球体上皮、肝実質細胞等の上皮組織は、外界から異物（微生物、アレルゲン、化学物質等）が侵入するのを防いでいる。かかる上皮組織を構成する上皮細胞の外界面は上端面（apical）、内側下面は基底面（basal）と呼ばれ、かかる基底面直下には、蛋白質やプロテオグリカン等の細胞外基質（ECM）から成る（細胞を含まない）基底膜と呼ばれる 5 0 ～ 1 0 0 n m の薄膜の構造体が存在する。基底膜は、未成熟な上皮細胞が増殖し、成熟した細胞に分化して、本来の形態や、機能を発現するのに必須の構造体と考えられている。即ち、基底膜なしでは上皮組織は自分自身の維持や本来のパフォーマンスが達成できない。多層又は単層の上皮細胞層はバリアーとして外界からの異物の侵入を防いでいるが、基底膜自体も物理的なバリアーとして作用する。このように、上皮組織を構成する上皮細胞と基底膜が協働して、強固なバリアーを形成し、体内の生命活動を保護している。

【 0 0 0 3 】

上皮細胞の他、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、シュワン細胞などの実質細胞と結合組織との界面に形成される細胞外基質の特異な膜状構造物である基底膜は、生体の各組織・臓器に普遍的に見い出される一方で、腎糸球体毛細血管ループや神経シナプス膜など高度に特化したものもある。したがって、細胞を間質に接着させるだけでなく、選択的な物質・細胞透過や細胞分化の誘導等の機能が明らかにされている。腎糸球体では、基底膜の陰性荷電が腎のろ過機能を担っているとみなされ、その陰性荷電は現在パールカンとよばれるヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）によることが古典的に知られている。HSPGは腎糸球体基底

膜だけでなく、種々の基底膜に、IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン等と同様に、その基本的構成分子としてひろく分布している。

【0 0 0 4】

細胞外マトリックス、特に基底膜は、上記のように個体の発生や分化等の生理現象だけでなく、癌の増殖転移や炎症などの病態形成にも深く関与していることが明らかとなりつつあり、その構成タンパク質の機能の解明が重要な課題となってきた。例えば、基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットからなる複合体で、15種類のアイソフォームが知られており、これらが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現している。ラミニンは様々な生物活性を有し、20種類以上のラミニンレセプターが報告されている分子量90万の複雑な巨大分子である。

【0 0 0 5】

細胞が接着可能な薄い細胞外マトリックス層である基底膜の構成成分と上皮細胞との相互作用が、移動、増殖及び分化等の細胞機能に影響を及ぼしている (Crouch et al., Basement membrane. .In The Lung(ed .R. G. Crystal and J. B. West), pp53.1-53.23. Philadelphia : Lippincott-Raven. 1996)。基底膜の主要成分としては、前記のように、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) 及びエンタクチンが知られており (Curr. Opin. Cell Biol. 6, 674-681, 1994)、ラミニン及びIV型コラーゲンのアイソフォームを含む基底膜成分の合成には、間充織細胞が重要な役割を担っていると考えられている (Matrix Biol. 14, 209-211, 1994、J. Biol. Chem. 268, 26033-26036, 1993) が、上皮細胞の役割もまた、重要なものである。H S P Gは、上皮細胞由来と考えられているが、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンは、上皮細胞及び間充織細胞の双方によって、インビボで合成される (Development 120, 2003-2014, 1994、Gastroenterology 102, 1835-1845, 1992)。連続した緻密層 (lamina densa) を示すインビトロでの上皮組織モデルを作製する試みが、今まで数多く行われてきた。腸 (J. Cell Biol. 133, 417-430, 1996) 及び皮膚 (J. Invest. Dermatol. 105, 597-601, 1995、J. Invest. Dermatol. 109, 527-533, 1997、Dev. Dynam. 197, 255-267, 1993) 等の組織モデルが研究されており、

いくつかの間充細胞由来基底膜成分が、基底膜形成に重要な役割を果たしていることも見い出されている。

【0006】

従来から、上皮細胞を培養することにより基底膜を構築し、基底面直下に基底膜構造体が存する上皮組織を構築する幾つかの方法が報告されている。例えば、本発明者らは、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養によりインビトロで基底膜が形成されることを報告した(Cell Struc.Func., 22: 603-614, 1997)。すなわち、肺線維芽細胞をI型コラーゲンゲルに包埋した状態で順化培養すると、肺線維芽細胞によってコラーゲンゲルは収縮し堅さを増し、また分泌された細胞外基質が細胞周囲のコラーゲン線維にまとわりついて沈着し、その形成物はインビボにおける間質と類似することから擬似間質と呼ばれ、この擬似間質化したI型コラーゲン線維上で、II型肺胞上皮細胞株(SV40-T2)を14日間程度培養する(T2-Fgel)と、肺線維芽細胞が分泌する細胞外基質中のIV型コラーゲンやラミニン等の基底膜構成成分が培地中に拡散して、上記II型肺胞上皮細胞株の基底面に到達し、基底膜構築材料として使われる結果、基底膜構造体が形成されることを報告した。

【0007】

また、希薄な中性コラーゲン溶液を、5%CO₂中37℃でインキュベートし、コラーゲン線維を形成させた後、無菌状態の中で風を当てて乾燥させた風乾コラーゲン線維基質(fib)を、上記擬似間質の代替物として用い、上記肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養の場合と同様にして、基底膜を形成することも報告されている(Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999, J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。この方法の場合、コラーゲン溶液の濃度が高いと、形成されたコラーゲン線維に隙間が少なく、あるいはなくなって、基底膜形成のため上皮細胞を長期間培養(10日～2週間)すると、細胞が剥がれて浮き上がることから(例:Becton Dickinson, Fibrillar collagen coat culture insert)、コラーゲン溶液濃度は、0.3～0.5mg/mlが最適であるとされている(Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999, J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。

【0008】

線維芽細胞を包埋したコラーゲンマトリックスを使用する代わりに、マトリゲル (Matrigel; Becton Dickinsonの登録商標) を加えたコラーゲン線維基質上で、II型肺胞上皮細胞株 (SV40-T2) を培養した。このときマトリゲルは、基底膜成分の外来性 (exogenous) 供給源として機能した。マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍マトリックスから抽出された基底膜調製物であり (J. Exp. Med. 145, 204-220, 1977)、ECM合成に影響を及ぼす可能性のある種々のサイトカインの他に、ラミニン-1、エンタクチン、IV型コラーゲン、パールカンを含んでいる (Exp. Cell Res. 202, 1-8, 1992)。基底膜に取り込まれたマトリゲルの成分を追跡するために、マトリゲルをビオチンで標識し、基底膜成分であるラミニン、エンタクチン、IV型コラーゲン、パールカンの免疫蛍光染色と電子顕微鏡観察により、マトリゲル量に依存して基底膜形成が促進し、点状に分泌された基底膜マトリックスがシート状に沈着して基底膜が発達してゆく過程が観察された。その結果、肺胞上皮細胞の下方にて、安定化した外来性ラミニン-1及びエンタクチンが、インビトロでの上記上皮細胞による基底膜の完全なる発達に大きく関与していることが明らかになっている (J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、線維性コラーゲン基質上に肺胞上皮細胞を培養する際に、線維芽細胞の順化、 $TGF-\beta$ 又はマトリゲルの存在下で培養することにより、上皮細胞直下の基質に基底膜構造体を形成させる方法等について研究を進め、II型肺胞上皮細胞の場合、図1に示されるように、II型肺胞上皮細胞を、カルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層 (線維芽細胞を包埋したコラーゲングル) 上で培養した場合 (T2-Fgel)、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合 (T2-fib-Fcm)、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合 (T2-fib-MG)、上部ウェル及び下部ウェルの成長因子 $TGF-\beta$ の共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合 (T2-fib- $TGF\beta$) に基底膜が形成されることを確認した。

【0 0 1 0】

また、内皮細胞の基底面直下に存在する基底膜も、内皮細胞の機能発現と維持に寄与しており、炎症性細胞が血管から組織に侵入する際、あるいはガン細胞が転移する際の障壁の役割を果たしていることから、内皮細胞（EC）による基底膜の構築についても検討したところ、II型肺胞上皮細胞の場合と異なり、図2に示されるように、上部ウェルの線維芽細胞マトリックス基層上で培養した場合（EC-Fgel）、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合（EC-fib-Fcm）、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合（EC-fib-MG）、上部ウェルの線維性コラーゲン基質上で培養した場合（EC-fib）には、（EC-Fgel）の場合を除き基底膜が形成されなかった。

【0 0 1 1】

ところで、本発明者らは、前記基底膜を形成した肺胞上皮細胞を、0.18Mの過酸化水素水で10分間処理し、1日間培養を継続すると、自動的に上皮細胞を基底膜から剥離させることができることを報告している（Cell Struc.Func., 22, 603-614, 1997）。しかし、かかる方法では、基底膜からの細胞の剥離が不十分であったり、基底膜の一部が損傷を受けたりする場合があります、かかる基底膜上に所定の基底膜形成能を有する同種又は異種の細胞を播種・培養しても、該細胞の機能発現と維持等十分に生理活性を有する人工ヒト組織を調製することができない場合があるという問題があることを見出した。本発明の課題は、基底膜形成能を有する同種又は異種の所定の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を簡便かつ短期間に提供することにある。

【0 0 1 2】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究し、界面活性剤、例えば0.1%トリトン（Triton）X-100（Calbiochem-Novabiochem Corporation）を用いると、その界面活性作用により細胞の脂質成分が溶解し、アルカリ性溶液、例えば、20～50mMのNH₃を用いると、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質

が溶解し、蛋白分解酵素阻害剤の混合液（PIC、protease inhibitors cocktail）を用いると、細胞が溶解する際に遊離してくるリソゾーム中の蛋白分解酵素等の内因性プロテアーゼ活性による基底膜の分解が抑制され、基底膜形成能を有する同種又は異種の所望の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を短時間に得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち本発明は、基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することを特徴とする基底膜標品の作製方法（請求項1）や、脂質溶解能を有する溶媒を用いて脱脂処理をした後、又は脱脂処理と同時にアルカリ溶液を用いて除タンパク・除核処理をすることを特徴とする請求項1記載の基底膜標品の作製方法（請求項2）や、脂質溶解能を有する溶媒が界面活性剤であることを特徴とする請求項1又は2記載の基底膜標品の作製方法（請求項3）や、界面活性剤がトリトンX-100（Triton X-100）であることを特徴とする請求項3記載の基底膜標品の作製方法（請求項4）や、アルカリ溶液がpH9～10のアルカリ溶液であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の基底膜標品の作製方法（請求項5）や、さらにプロテアーゼ阻害剤を用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の基底膜標品の作製方法（請求項6）に関する。

【0014】

また本発明は、基底膜が、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の基底膜標品の作製方法（請求項7）や、基底膜が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の基底膜標品の作製方法（請求項8）や、請求項1～8のいずれか記載の基底膜標品の作製方法により得られることを特徴とする基底膜標品（請求項9）や、支持体から遊離状態にあることを特徴とする請求項9

記載の基底膜標品（請求項 1 0）に関する。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】

本発明の基底膜標品の作製方法としては、基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去する方法であれば特に制限されるものではないが、脂質溶解能を有する溶媒を用いて脱脂処理をした後、又は脱脂処理と同時にアルカリ溶液を用いて除タンパク・除核処理をする方法が好ましい。ここで基底膜標品とは、基底膜形成能を有する同種又は異種の所望の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜を意味し、上記基底膜形成能を有する細胞としては上皮細胞、内皮細胞、間充織細胞などを挙げることができ、上記上皮細胞としては表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞、肝実質細胞等を、上記内皮細胞としては腎臓子球体毛細血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞、大動脈血管内皮細胞等を、間充織細胞としては筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞等をより具体的に例示することができ、上記基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞には、通常かかる細胞の集合体である組織、好ましくはヒト等の人工組織が含まれる。かかる人工組織（組織モデル）としては、細胞層とその直下の基底膜を含む組織であればどのようなものでもよいが、例えば、表皮組織モデル、角膜上皮組織モデル、肺胞上皮組織モデル、気道上皮組織モデル、腎糸球体組織モデル、肝実質組織モデル、肺動脈血管内皮組織モデル等を具体的に挙げることができる。

【 0 0 1 6 】

上記細胞の脂質溶解能を有する溶媒としては、界面活性剤や有機溶媒等の上皮細胞や内皮細胞の脂質を溶解しうる溶媒であれば制限されるものはないが、トリトン X-100、Lubrol PX、デオキシコール酸、コール酸、Tween、エマルゲン等の界面活性剤が好ましく、中でもトリトン X-100 が特に好ましい。界面活性剤等の脂質溶解能を有する溶媒の使用濃度としては、適用する細胞の種類や処理時間にもよるが、例えばトリトン X-100 の場合、0.01～1.0

%、特に0.1%前後が好ましい。また、上記アルカリ溶液としては、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質を溶解し、基底膜の蛋白までは溶解しないアルカリ溶液であればどのようなものでもよいが、pH 9~10のアルカリ溶液が好ましく、例えば、20~50 mMの NH_3 や1 mMの NaOH 等のアルカリ性溶液を具体的に挙げることができる。

【0017】

また、細胞が溶解する際に遊離してくるリソゾーム中のDNase I等の蛋白分解酵素などの内因性プロテアーゼ活性による基底膜の分解を抑制するため、プロテアーゼ阻害剤、好ましくは蛋白分解酵素阻害剤の混合液（PIC、protease inhibitors cocktail）を添加したリン酸緩衝液中で行う方法が好ましい。さらに、本発明の基底膜標品の作製方法においては、人工ヒト組織等の基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞にあらかじめ2 mMの Na_3VO_4 等のバナジウム塩を用いて前処理することもできる。バナジウム塩を用いて前処理すると、基底膜から細胞の剥離がよくなるが、バナジウム塩の洗浄が必要となる。

【0018】

基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞、好ましくはヒト等の人工組織の調製方法としては、公知の人工組織の調製方法の他、本発明者により開発された新たな調製方法を挙げることができる。上記公知の人工組織の調製方法としては、図1に示されるように、上皮細胞を、カルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層上で培養した人工組織（T2-Fgel）の調製方法、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織（T2-fib-Fcm）の調製方法、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織（T2-fib-MG）の調製方法、上部ウェル及び下部ウェルの成長因子 $\text{TGF-}\beta$ の共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織（T2-fib-TGF β ）の調製方法を好適に挙げることができる。また、図2に示されるように、内皮細胞をカルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層上で培養した新規人工組織（EC-Fgel）の調製方

法を好適に挙げることができる。

【0019】

ところで、基底膜の調製には、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）、エンタクチン等の基底膜構成成分が必要とされ、また個々の基底膜形成能を有する細胞は基底膜構成成分を分泌するが、かかる細胞から分泌される基底膜構成成分は、細胞の基底面（下面）から線維性コラーゲンマトリックスが形成する細胞外基質の内部に向かって分泌される。したがって、分泌された基底膜成分の大部分は基底面表面から離れてしまい反対側から培地中に拡散したり、途中で蛋白質分解酵素に分解されたりして、通常有効利用されない。しかし、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより、上記上皮細胞や内皮細胞などの基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分を好適に活用することができる。すなわち、本発明者により開発された新たな人工組織の調製方法として、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより人工組織を調製する方法を挙げることができる。

【0020】

そして、上記新たな人工組織の調製方法においては、基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分に加えて、外生の基底膜構成成分等をも利用して短期間で人工組織を調製することができるように、基底膜構成成分及びTGF- β を分泌する線維芽細胞、好ましくは線維芽細胞の順化培地や、基底膜構成成分を豊富に含有するマトリゲルなどの線維芽細胞代替物と共培養することもできる。また、同様に短期間で人工組織を調製することができるように、基底膜形成能を有する細胞を、別途調製されたラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）、エンタクチン等の基底膜構成成分の1種又は2種以上の存在下で培養したり、TGF- β の存在下で培養することもできる。上記ラミニンやHSPGは市販品が用いることができ、IV型コラーゲンとして

は、牛レンズカプセルから酢酸抽出したものを有利に用いることができる。上記ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)、エンタクチン等の基底膜構成成分やTGF- β を用いる方法は、コスト高になることから、基底膜形成能を有する細胞や線維芽細胞として、基底膜構成成分の1種又は2種以上の遺伝子が導入された基底膜構成成分高発現細胞や、TGF- β の遺伝子が導入された成長因子高発現細胞を選抜・使用することができる。

【0021】

上記基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖としては、糖鎖又は該糖鎖の一部が上記レセプターと結合することにより、基底膜形成能を有する細胞を支持体上に接着しうる糖鎖、中でも、レセプターと結合する糖鎖又は該糖鎖の一部が前記基底膜構成成分と置換しうる糖鎖を用いることが好ましい。また、糖鎖を備えた支持体としては、かかる糖鎖を有する一体成形体、あるいは、糖鎖を有するポリマーをコーティングした支持体であることが好ましく、該糖鎖を有するポリマーとしては、 β -D-グルコピラノース (β -D-glucopyranosyl) 非還元末端又は2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース (2-acetoamide-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl) 非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーを例示することができる。また、かかる β -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーとしてはPV-CAやPV-Lam等、2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーとしてはPV-GlcNAc等のビニル系モノマーにオリゴ糖を導入した高分子ポリマー (PV-sugar) をより具体的に例示することができる。そして、これらPV-sugarは1種単独の他、2種以上の混合物を用いてもよく、これらPV-sugarは市販のものを用いることができる。

【0022】

また、本発明者により開発された新たな方法による人工組織の他の態様としては、支持体の相対する2つの基層面上で、基底膜形成能を有する細胞を培養する方法を挙げることができ、例えば、多孔性メンブレン膜の両側に線維性コラーゲンを作製し、その両側に上皮細胞と血管内皮細胞の組み合わせなど、2種類の基

底膜形成能を有する細胞を播種・培養すると、基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分の拡散が防止され、基底膜成分の有効利用率を高めることができる。すなわち、一方の細胞が分泌する基底膜構成成分が、線維性コラーゲンの反対側に位置する他方の細胞に辿り着き、かかる細胞が形成する細胞-細胞間結合（密着結合）で隙間の無い障壁により阻まれて、培地中に拡散することがなく、その結果、基底膜成分の有効利用率を高めることができる。図3の上段には、コラーゲンゲル包埋線維芽細胞存在下、コラーゲン線維を介しての上皮細胞と血管内皮細胞の共培養による基底膜の形成（左）、糖鎖を備えた支持体であるコラーゲン線維の薄膜を介しての上皮細胞と血管内皮細胞の共培養による基底膜の形成（中）、コラーゲン線維を介しての上皮細胞と線維芽細胞の共培養による基底膜の形成（右）が模式的に示されており、また、図3の下段には、所望の細胞組織ではない方の細胞組織、すなわち、血管内皮組織（左）、上皮組織（中）、線維芽細胞（右）を機械的に剥がして取り除いた状態が示されている。これら細胞の組合せとしては、上皮細胞と血管内皮細胞、上皮細胞と上皮細胞、内皮細胞と内皮細胞、上皮細胞又は内皮細胞と一部の間充織細胞等が考えられる。

【0023】

また、基底膜形成能を有する細胞が基底膜を介して接着している上記支持体としては、線維性コラーゲンマトリックス、多孔性PET膜、ポリスチレンプレート、（合成）エラスチンポリマー、生体吸収性ポリマーなどを例示することができるが、栄養塩、老廃物の拡散を確保する点で線維性コラーゲンマトリックスが好ましく、かかる線維性コラーゲンマトリックスとしては、線維芽細胞によって収縮されるコラーゲンゲルの高密度マトリックスを用いることもできる。この場合、コラーゲンの生合成を高めるため、ascorbic acid-2-phosphate（Asc-P）を添加することもできる。中性I型コラーゲン溶液をCO₂インキュベーター内で静置してインキュベートし、ポリマー化したゲルを、室温下に風乾した線維性コラーゲンマトリックスを用いることもできる。また、生体吸収性ポリマーを用いると、支持体に担持された基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことから好ましく、かかる生体吸収性ポリマーとしては、ポリグリコール酸、ポリ

ーL-乳酸、L-乳酸-グリコール酸共重合体、グリコール酸-ε-カプロラクトン共重合体、L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体、ポリ-ε-カプロラクトン等を具体的に例示することができる。

【0024】

本発明の基底膜標品としては、上記本発明の基底膜標品の作製方法により得られるものであればどのようなものでもよく、かかる上皮細胞や内皮細胞等が剥離され、基底膜が露出した基底膜標品、例えば、上皮細胞や内皮細胞等が形成した基底膜構造体とコラーゲン線維等の支持材からなる上記基底膜標品は、他の細胞の培養に利用することができる（図4参照）。上皮の基底膜と内皮の基底膜とは同じものとはいえないものの構成成分の多くが共通し、上皮細胞が形成した基底膜を内皮組織の構築に転用することができ、例えば、基底膜標品上に目的とするヒト上皮細胞やヒト内皮細胞を播種し、培養するだけでヒト上皮組織やヒト内皮組織を再構築することができる。実際、肺胞II型上皮細胞が形成した基底膜上に肺動脈内皮細胞を播種・培養し、肺動脈内皮組織を構築することができることを確認している。基底膜構造体上に上皮細胞ないし血管内皮細胞を播種し、新たな組織を形成させる際、目的とする組織や臓器の間質細胞（線維芽細胞）を共存させると、基底膜の新陳代謝が円滑になることから好ましい。また、基底膜は、細胞が接着した状態では保存出来ないが、細胞が除去され非細胞成分のみで構成される本発明の基底膜標品は、保存が容易であり、必要時に、何時でも、何処でも使用できるという利点を有する。そして、基底膜標品の保存は、冷蔵でも冷凍でも全く問題がなく行うことができる。

【0025】

上記のように、本発明の基底膜標品を利用した上皮組織や内皮組織などの再構築方法は汎用性が高く、例えば、ラットの肺胞上皮細胞を用いて作製した基底膜はヒトの組織構築にも使用することが可能であり、また、かかるラット肺胞上皮細胞由来の基底膜から構築される臓器や組織も肺胞に限定されるものではない。これに対し、個々の臓器の上皮細胞や内皮細胞を培養して基底膜を形成させ、上皮組織や内皮組織などを構築する場合には、個々の細胞に応じた培養系を開発するのに、多くの時間と労力が必要であり、また、それぞれの組織用に基底膜を個

別に用意するのでは無駄が多いが、上記のように、本発明の基底膜標品を組織再構築用共通ベース資材として使うことによって、効率化を図ることができる。そして、基底膜標品を利用して上皮組織や内皮組織などを再構築する場合の培養容器としては特に制限されず、カルチャーインサート方式の他、ホロファーバー方式にも応用することができ、例えば、人工血管に適用する場合は、人工血管における問題点である血栓の発生を防止することができ、また、人工透析に適用する場合は、患者への負担が軽減できる。

【0026】

このように、本発明の基底膜標品から再構築された組織モデルや臓器モデルも、従前の組織モデルと同様に、生体本来のバリアー機能を備えた細胞層と基底膜構造を有していることから、生体本来のバリアー機能を備えており、化学物質等の薬理試験、毒性試験等へ有利に応用することができる。例えば、被検物質を上皮組織モデルの細胞層上に存在せしめ、上皮細胞の上面と基底面間の電気抵抗を測定することにより、上皮組織に対する被検物質の安全性や毒性を試験することができる。被検物質により肺胞上皮組織に軽微だが傷害が生ずれば、電気抵抗が低下することから、被検物質の安全性や毒性を評価することができる。また、被検物質を上皮組織モデルの細胞層上に存在せしめ、上皮細胞や基底膜の状態を走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡で観察することにより、上皮組織に対する被検物質の安全性や毒性を試験することができる。

【0027】

さらに、本発明の基底膜標品の他の態様として、支持体から遊離状態にある基底膜標品を挙げることができる。プラスチック膜等を有さない基底膜標品やプラスチック表面に固着していない本発明の基底膜標品、例えば、コラーゲン線維上に形成された基底膜標品を直接局所に移植することにより、基底膜形成能を有する細胞が基底膜標品上で増殖し、局所における組織等を生体内で構築することができる。また、プラスチック膜等を有さない基底膜標品やプラスチック表面に固着していない基底膜標品、例えば、コラーゲン線維上に形成された基底膜標品を利用して再構築された組織や臓器等は、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことから、その汎用性が一層高く、その適用例として、内径 3 mm 以下の微

細人工血管や、体内埋込み型のヒト人工組織等を例示することができ、特に、人工子球体、人工肝臓、人工肺胞など上皮組織と内皮組織が近接する組織や臓器を好適に例示することができる。上記プラスチック膜等を有さない基底膜標品の作製には、反応性の官能基（反応基）を有するポリマー、より詳細には、プラスチック表面に吸着することができる、ポリビニール鎖、直鎖状アミノ酸ポリマー（ポリグリシン、ポリアラニン等）などの疎水性の直鎖状骨格を持つポリマーで、該疎水性の直鎖状骨格に直接、あるいは、スペーサーを介して、コラーゲン等の蛋白質と反応できる反応基を有するポリマーを好適に用いることができる。これらのポリマーは、前記疎水性の直鎖状骨格により、化学結合でなく疎水性結合でプラスチック表面に吸着されることから、プラスチックの種類や材質に関係なく用いることができ、例えば、コラーゲン線維上に形成された基底膜標品を利用して組織や臓器等を構築する場合、培養後の操作中に基底膜標品がプラスチック膜から剥がれて、その使用価値を失うといったおそれがない一方で、必要に応じてプラスチック膜やプラスチック表面から容易に機械的に剥離させることができる。

【0028】

また、上記反応基としては、タンパク質の官能基と反応して、結合しうるものであれば特に制限されるものではなく、無水カルボン酸型の反応基、アミノ基、SH基等を例示することができる。上記無水カルボン酸型の反応基としては、無水マレイン酸基を好適に例示することができ、タンパク質のN末端アミノ基、リジンε-アミノ基、SH基等の官能基と結合する。上記アミノ基はタンパク質のカルボキシル基と反応するが、化学結合とするためペプチド縮合剤を添加することが好ましい。上記SH基はタンパク質のSH基と主として反応し、時には、S-S結合とSS交換反応で結合することもある。そして、かかるSH基に、前記疎水性の直鎖状骨格とコポリマーを形成することができる範囲内で、簡単に外れる可逆的な保護基をつけることもできる。

【0029】

かかる反応性の官能基を有するポリマーとして、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体（MMAC；methyl vinyl ether / maleic anhydr

ide copolymer) を具体的に挙げることができ、MMA C の場合、メチレン基を骨格とする直鎖ポリマーが、プラスチック表面に疎水性結合で吸着することを可能にしているが、 $-CH_2-CH_2-$ 骨格だけだとあまりにも疎水性で、水との親和性が低くなり、微視的には水をはじいて、反応性に支障がでる可能性があり、そこで、メチレン基の H 原子の一部を CH_3O 基で置換し、O 原子の存在により反応効率が高まると考えられている。なお、 CH_3O 基に代えて OH 基で置換すると、分子間で無水カルボン酸とエステル結合を作ることから好ましくない。また MMA C は、エタノールに可溶のため、アセトン等を必要とするポリマーよりも使い易い上に、塗布後に速やかに風乾できる。そして、MMA C における反応基である無水マレイン酸は、コラーゲン等のタンパク質のアミノ基と結合することになるが、この無水マレイン酸がたとえ水と反応してカルボン酸になったとしても、タンパク質の + の電荷とイオン結合することができる。コラーゲンタンパク質は、分子内にリジン残基を有しており、側鎖の ϵ -アミノ基がその結合相手になると考えられる。

【0030】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (基底膜を形成する上皮細胞・内皮細胞等)

上皮細胞として、Dr. A. Clement, Hopital Armand Trousseau, Paris (Clement et al., Exp. Cell Res., 196: 198-205, 1991) から供与された肺胞 II 型上皮細胞 (SV40-ラージ T 抗原遺伝子をトランスフェクトしたラットから採取; T2 細胞) を、10 mM の 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] エタンスルホン酸 (HEPES) (pH 7.2)、10% ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah)、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) において、空気 95% / CO_2 5% の大気条件下で培養して用いた。また、内皮細胞として、クローンテックス (Clonetics) 社から購入したヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAE 細胞) を、10 mM の HEPES (pH 7.2)、2% FBS、成長因

子、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加したMCDB 131単独又はMCDB 131とDMEMの等量混合培地において、空気95%/CO₂5%の大気条件下で培養して用いた。線維芽細胞は、雄ラットJcl:Fischer 344由来の肺線維芽細胞を文献 (CELL STRUCTURE AND FUNCTION 22: 603-614, 1997) 記載の方法に準じて調製したもの、及び、クローンテックス社から購入したヒト肺線維芽細胞を用いた。

【0031】

実施例2 (線維性コラーゲンゲルの調製)

コラーゲンゲル線維を、通常線維芽細胞によって構築されるコラーゲンゲルの密度マトリックスを模して調製した。DMEM (pH 7.2) における中性I型コラーゲン溶液 (0.42 ml のウシ真皮から酸抽出で採った0.3~0.5 mg/ml のI型コラーゲン; Koken Co., Tokyo) を、6 ウェル培養プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) のポリエチレンテレフタル酸エステル膜と共に、4.3 cm²の培養線維芽細胞層に投入し、CO₂インキュベーターで、数時間~24時間インキュベートし、ゲル化した。このゲルを、室温下24~48時間風乾して圧縮し、高密度コラーゲン線維 (fib) として使用した。上記線維芽細胞としては、雄ラットJcl:Fischer 344由来の肺線維芽細胞を文献 (CELL STRUCTURE AND FUNCTION 22: 603-614, 1997) 記載の方法に準じて調製した。

【0032】

実施例3 (組織モデルの構築1)

肺胞II型上皮細胞及び血管内皮細胞層の直下に基底膜を有する上皮組織及び内皮組織の形成法を、それぞれ図1及び図2に示した。最も基本的な組織モデルの構築するために、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上に直接上記上皮細胞 (T2) 又は内皮細胞 (HPAEC) を播種し2週間培養した (図1のT2-Fgel, 図2のEC-Fgel)。また、上記fibを培養基質に用いて基底膜を有する上皮組織及び内皮組織を形成するために、fib上に直接上皮細胞 (T2) 又は内皮細胞 (HPAEC) を播種し2週間培養した (図1のT2-fib-Fcm, T2-fib-MGとT2-fib-TGF β)。図1において、Fcmは、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル (Fg

el) との共培養、MGは、マトリゲル 200 μ l (ベクトンディッキンソン社製) を培養皿底にコーティングした培養、TGF β は、1 ng/ml の TGF β 添加した培養を示す。

【0033】

実施例 4 (組織モデルの構築 2)

4-1 (上皮細胞・内皮細胞におけるレセプターの存在の確認)

10 μ g/ml 濃度の各種 PV-Sugar (生化学工業社製) を、製造者のプロトコールに従い、96 穴ポリスチレン製プレート (ベクトンディッキンソン社製) にコーティングし、その上にラット肺胞 II 型上皮細胞を 1×10^4 個まき、10 mM HEPES (pH 7.2) と 1% FBS を添加した DMEM 中、CO₂ インキュベーターで 37℃、24~48 時間インキュベートした。インキュベート後、クリスタルバイオレットで細胞を染色し、595 nm の吸光度を測定して細胞数とすることにより、各種 PV-Sugar との接着性について調べた。また、細胞接着因子のファイブロネクチン (FN) 及びビトロネクチン (VN) コートに対する細胞接着も同時に行い、対照実験とした。結果を図 5 に示す。図 5 の横軸には、種々の非還元末端糖鎖の PV-sugar (GlcNAc; 2-acetoamide-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl, Lam; β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)、CA; β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)、LA; β -D-galactopyranosyl, MA; α -D-glucopyranosyl, Man; β -D-mannopyranosyl, MEA; α -D-galactopyranosyl) が示されている。図 5 から、肺胞 II 型上皮細胞は、2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖をもつ PV-GlcNAc、 β -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖をもつ PV-CA や PV-Lam、 β -D-ガラクトピラノース非還元末端を有する糖鎖をもつ PV-LA に対し強い接着を示すことがわかった。これらの結果から、肺胞 II 型上皮細胞は、その基底面にこれら糖鎖に対するレセプターを発現することが示された。

【0034】

4-2 (肺胞 II 型上皮細胞による基底膜の調製)

基底膜の調製には、下部ウェルと、該下部ウェルに同心円上に収納され、底部に PET 膜を有する上部ウェルからなるカルチャーインサートを用いた (図 1 を

参照)。上部ウェルの底部PET膜上に、実施例3で示した方法で作製した高密度コラーゲン線維 (f i b) にDMEMに溶解した $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のPV-GlcNAc、PV-CA又はPV-Lamをコーティングした支持体 (f i b*) 上で、肺胞II型上皮細胞を 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で2週間培養した。この培養では、線維芽細胞を包埋したコラーゲングル (Fgel)、マトリゲル (MG) 又は $\text{TGF}\beta$ を培養系に添加せず、培養液には 10mM のHEPES (pH 7. 2)、 $1\%\text{FBS}$ と 0.2mM ascorbic acid-2-phosphate (A s c - P) を添加したDMEMを用いた。形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図6に、形成された肺胞上皮組織の表面の肺胞II型上皮細胞層を実施例5 (後述) に示す方法で除去し、露出した肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を図7に示す。

【0035】

図6中、太矢印は基底膜緻密板 (lamina densa) を、細矢印は培養初期に形成され、一部は分解されつつある旧基底膜を、鋸は基底膜が形成されていない領域をそれぞれ示す (スケールの長さは $1\mu\text{m}$)。また図7のPV-sugar未処理 (Cont) では、既存のf i b (コラーゲン線維、白抜き太矢印) に上皮細胞の分泌物が集積している個所 (*) が認められるにすぎないが、PV-GlcNAc、PV-Lam、PV-CA処理では、基底膜が平面状 (図6の太矢印に対応) に形成されており、PV-Lam処理では、肺胞II型上皮細胞層を除去する際に、一部失われた基底膜の欠損窓から、下部のコラーゲン線維 (白抜き太矢印) が垣間見える (スケールの長さは $1\mu\text{m}$)。これらの結果から、2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース非還元末端を有するPV-GlcNAcや β -D-グルコピラノース非還元末端を有するPV-CAやPV-Lamでコーティングした高密度コラーゲン線維支持体 (GlcNAc-fib*, CA-fib*, Lam-fib*) 上で培養すると、肺胞II型上皮細胞層の直下に基底膜が形成された肺胞上皮組織が構築されることを確認した。また、 β -D-ガラクトピラノース非還元末端を有するPV-LAに対して、肺胞II型細胞は接着するが (図5)、基底膜は形成されなかった (図6及び図7)。このことは、糖鎖に対する細胞接着は、基底膜形成の必要条件ではあっても、十分条件ではないことを示している。

【0036】

4-3 (マトリゲルによる基底膜形成を促進する効果)

図1のT2-fib-MGに示した様に、下部ウェルにマトリゲル $200\mu\text{l}$ をコーティングし、高密度コラーゲン線維 (f i b) 上で肺胞上皮細胞を2週間培養すると上皮細胞直下に基底膜が形成される。しかし、マトリゲルの量が $50\mu\text{l}$ に満たないと基底膜は形成されない (J. Cell Sci., 113: 589-868, 2000)。この場合にあっても、実施例3に示した方法で高密度コラーゲン線維 (f i b) を作製し、実施例4に示した方法でPV-GlcNAc, PV-CA又はPV-Lamでコーティングした培養基質 (f i b*) を用いると、10日間培養で肺胞II型上皮細胞層直下に基底膜が形成される。図8には、種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維 (f i b*) 上で、培養皿底面にコーティングした $25\mu\text{l}$ マトリゲルと10日間共培養し、形成した上皮組織の透過型電子顕微鏡写真 (左側：未処理、及びPV-GlcNAc, PV-CAコーティング)、及び実施例5 (後述) に示す方法で肺胞上皮細胞層を除去し、直下の基底膜構造体を表面に露出させ走査型電子顕微鏡で撮影した (右側：未処理、及びPV-GlcNAc, PV-CAコーティング) 結果が示されている (記号の意味及びスケールは実施例4-2と同じ。)。これらの結果から、マトリゲルの量が不十分の場合でも、PV-GlcNAc又はPV-CAでコーティングした高密度コラーゲン線維支持体 (GlcNAc-fib*, CA-fib*) を用いることにより、肺胞II型上皮細胞層の直下に基底膜が形成された肺胞上皮組織が構築されることを確認した。

【0037】

4-4 (ヒト肺動脈血管内皮細胞による基底膜の調製)

ヒト肺動脈血管内皮 (H P A E) 細胞を、図2に示した方法で培養した。すなわちヒト線維芽細胞を包埋したコラーゲングル (Fgel) 上に直接培養 (EC-Fgel)、Fgel共存下で高密度コラーゲン線維 (f i b) 上に培養 (EC-fib-Fcm)、 $200\mu\text{l}$ のマトリゲルと共にfib上で共培養 (EC-fib-MG)、及びf i b上で培養 (EC-fib) した。培養後、表面のH P A E細胞層を実施例5 (後述) の方法で除去し、細胞直下の細胞外基質構造を走査型電子顕微鏡で観察した (図9)。EC-Fgelの場合は基底膜が形成されたが、EC-fib-Fcm, EC-fib-MG, EC-fibの場合には既存のコラーゲン線維が露出し、T2細胞の場合 (T2-fib-Fcm, T2-fib-MG) の

様に基底膜は形成されなかった（白抜き太矢印はコラーゲン線維。＊はコラーゲン線維間に沈着した分泌物。スケールの長さは1 μ m。）。そこで、EC-fib-Fcmの培養系を用いて、実施例5の肺胞II型上皮細胞の場合と同様に、PV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維支持体（fib＊）上で培養した。培養後、表面のHPAE細胞層を実施例5の方法で除去し、露出した細胞直下の細胞外基質構造を、走査型電子顕微鏡で観察した（図10）。PV-GlcNAc, PV-CAコーティングの場合に、基底膜の形成が認められた。PV-Lamコーティングの場合には、基底膜の形成が不完全だった。PV-sugar未処理（Cont）及びPV-LA, PV-MA, PV-Man, PV-MEA処理では、既存のコラーゲン線維（白抜き太矢印）に上皮細胞の分泌物が集積（＊）しているが、基底膜は形成していない。これらの結果から、PV-GlcNAc, PV-CAコーティングしたfib＊（GlcNAc-fib＊, CA-fib＊）を用いると、ヒト肺動脈血管内皮細胞層の直下に基底膜が形成されたヒト肺動脈内皮組織が構築されることを確認した。

【0038】

実施例5（肺胞上皮細胞層が除去され、基底膜が露出した基底膜標品の作製）

組織モデル（T2-fib-MG）から、図4に模式的に示されているように、II型肺胞上皮細胞層を剥離し、基底膜が露出した基底膜標品を作製し、作製した基底膜構造体上に、ラット気道上皮細胞又はヒト肺動脈血管内皮細胞を播種し、気道上皮組織や血管上皮組織を作製した。まず、カルチャーインサートの上部ウェルのII型肺胞上皮組織に、蛋白分解酵素阻害剤の混合液（PIC、ペプチド研究所社製、大阪）を添加した等張のリン酸緩衝液（pH 7.2；PBS（－））中で、0.1%のトリトンX-100（界面活性剤）2mlを用いて、上皮細胞の脂質成分を溶解・溶出すると同時に、共存する50mM NH₃で、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質を溶解する操作を2回（基底膜の蛋白までは溶かしてはならない）繰り返した後、再度PICを含むPBC（－）溶液で基底膜から界面活性剤とアルカリ洗浄をすることによって、肺胞上皮細胞層を剥離して基底膜が露出した基底膜標品を作製した。

【0039】

参考例1（基底膜構造体上でのラット気道上皮組織の構築）

実施例 5 で構築した基底膜構造体上に、ラット気道上皮細胞株 (S P O C 1、米国 N I E H S より供与) を 5×10^5 個播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、 10mM の H E P E S (p H 7. 2) と $1\% \text{FBS}$ を添加した、H a m' s F 1 2 : D M E M = 1 : 1 の混合培地中で 1 週間培養して、気道上皮組織を構築した。基底膜構造体上に構築された気道上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図 1 1 とし示す。図 1 1 A は基底膜構造体上の気道上皮細胞を示し、図 1 1 B は気道上皮細胞が肺胞上皮細胞由来の基底膜を認識してアンカリングフィラメントで繋がっている、気道上皮細胞の基底面と基底膜構造体との強拡大の境界面を示し、図 1 1 C は細胞-細胞間結合で気道上皮細胞同士が結合して上皮組織を形成していることを示している。

【0040】

参考例 2 (基底膜構造体上でのヒト血管上皮組織の構築)

実施例 5 で構築した基底膜構造体上に、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (クローンテック社製) を 5×10^5 個播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、 10mM の H E P E S (p H 7. 2) と $2\% \text{FBS}$ を添加した、M C D B 1 3 1 : D M E M = 1 : 1 の混合培地中で 2 週間培養して、ヒト血管上皮組織を構築した。基底膜構造体上に構築されたヒト血管内皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図 1 2 とし示す。図 1 2 A には線維芽細胞との共培養により構築したヒト血管上皮組織を、図 1 2 B にはマトリゲル共存下で構築したヒト血管上皮組織を示している。

【0041】

【発明の効果】

本発明によると、基底膜形成能を有する同種又は異種の所定の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を得ることができ、この基底膜の標品を用いることにより、基底膜構造体をもつ上皮組織モデルや内皮組織モデルを穏和な条件で再構築することができ、またかかる方法で調製した基底膜構造体は他組織の上皮組織や内皮組織をも形成させることが可能となった。これら基底膜構造体及び上皮組織・内皮組織は、医学・生物学の研究用に、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等として移植・治療用に、薬理試験や毒性試験用に利用するこ

とができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

肺胞上皮細胞による基底膜形成を示す模式図である。

【図 2】

肺動脈内皮細胞による基底膜形成を示す模式図である。

【図 3】

上皮細胞と内皮細胞の共培養による基底膜の形成を示す模式図である。

【図 4】

再構成基底膜標品を用いた内皮組織や上皮組織の構築を示す模式図である。

【図 5】

肺胞II型細胞の糖鎖接着の特異性を示す図である。

【図 6】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b *）上で2週間培養した結果形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 7】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b *）上で2週間培養した結果形成された肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 8】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b *）上で、培養皿底面にコーティングした25 μ lマトリゲルと10日間共培養した結果形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真（左）と肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真（右）を示す図である。

【図 9】

図2の培養方法によるヒト肺動脈血管内皮細胞の基底膜形成の結果を示す細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 10】

種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b *）上にヒト肺動脈血管内皮細胞を播種し、肺線維芽細胞を包埋したコラーゲングルと2週間共培養した（EC-fib*-Fcm）結果形成された血管内皮細胞層直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 1 1】

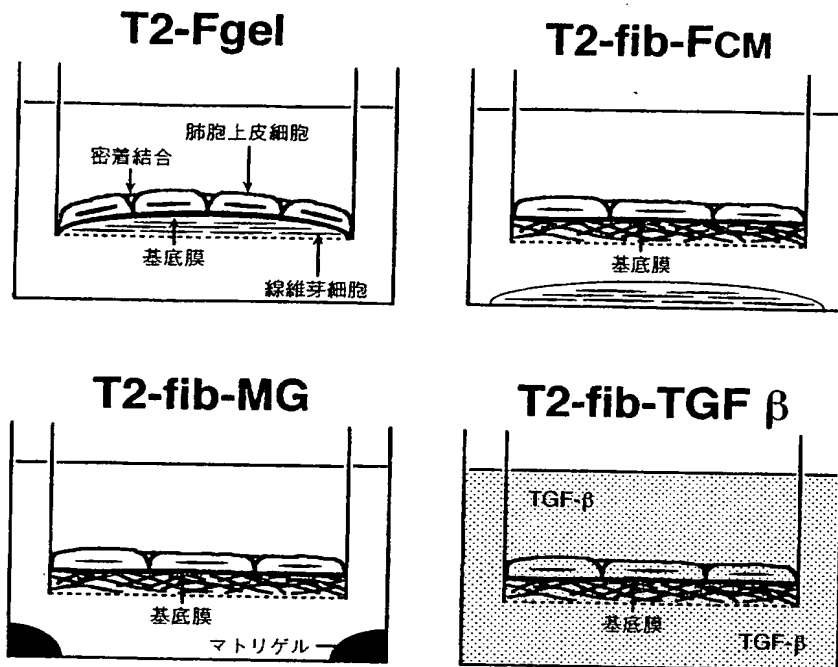
基底膜構造体上に再構築された気道上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 1 2】

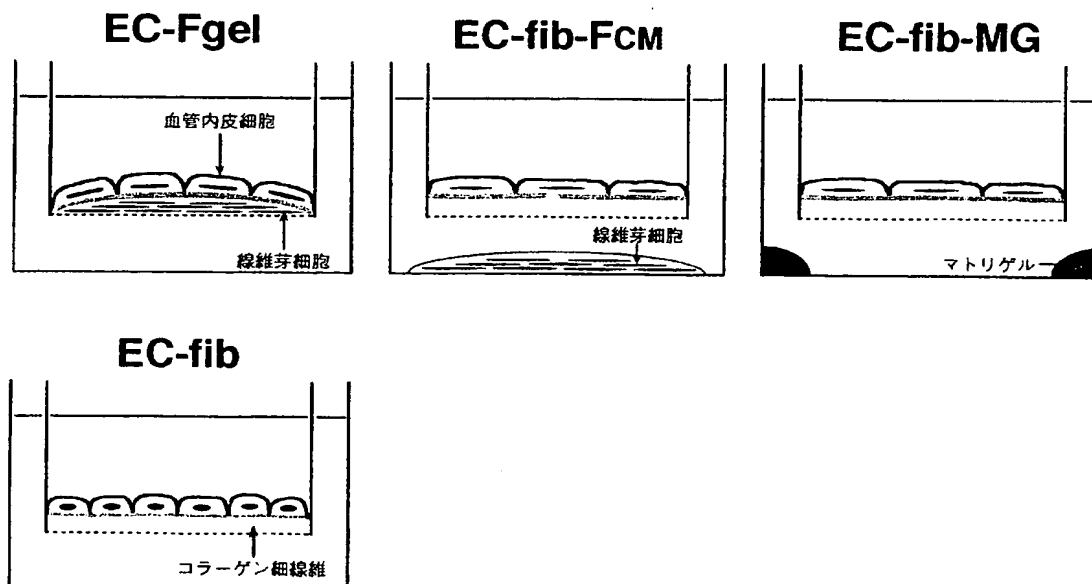
基底膜構造体上に再構築されたヒト血管内皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

【書類名】 図面

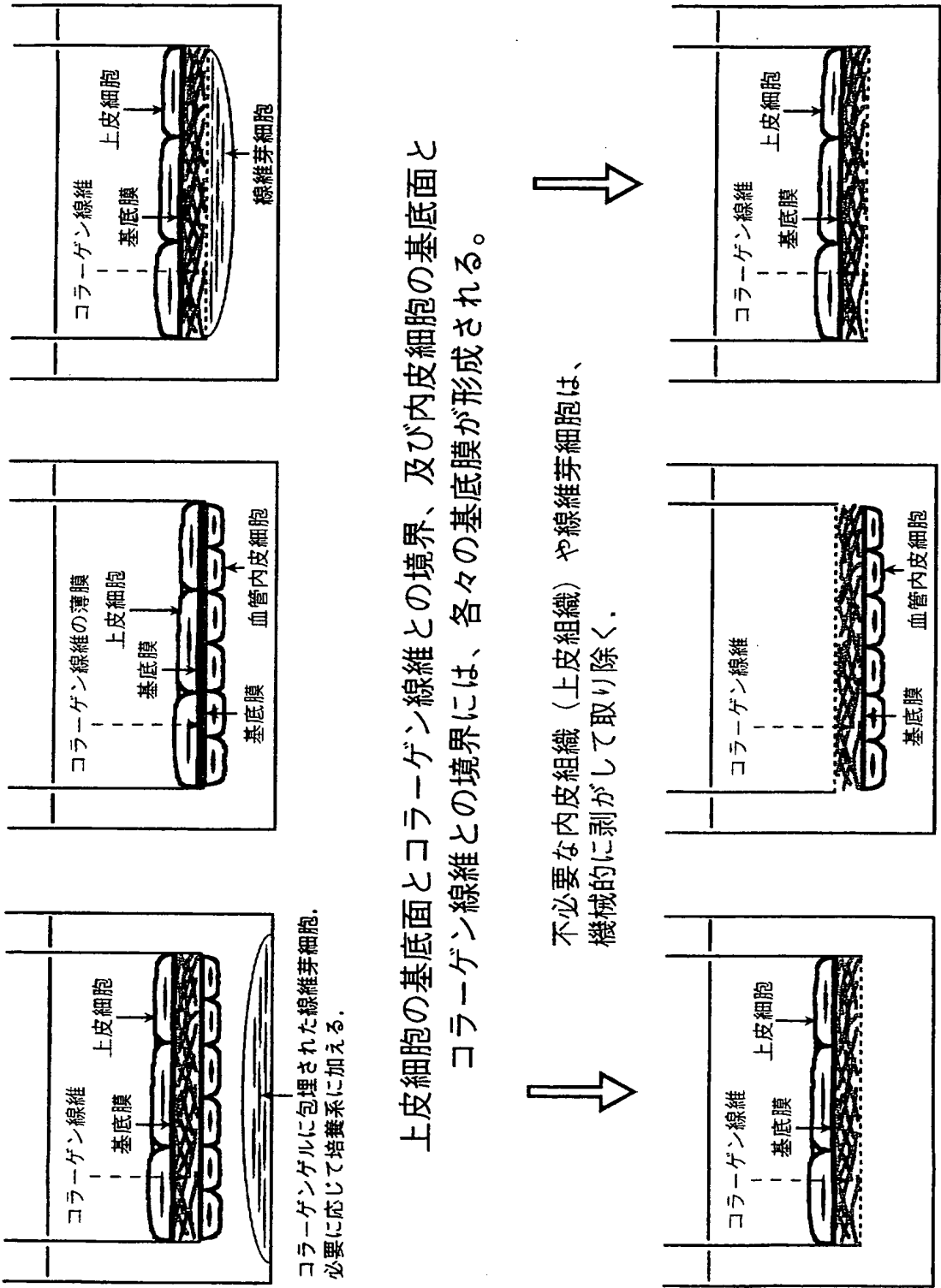
【図 1】



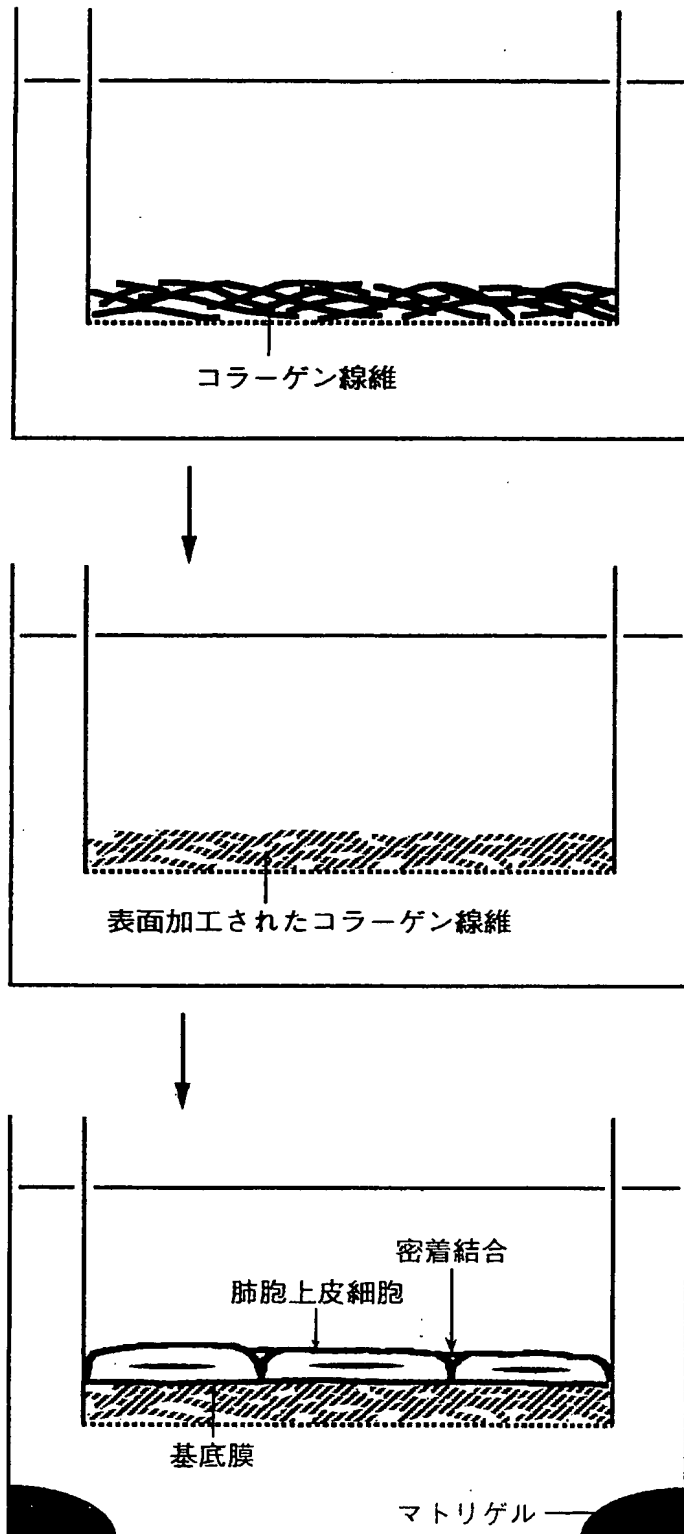
【図 2】



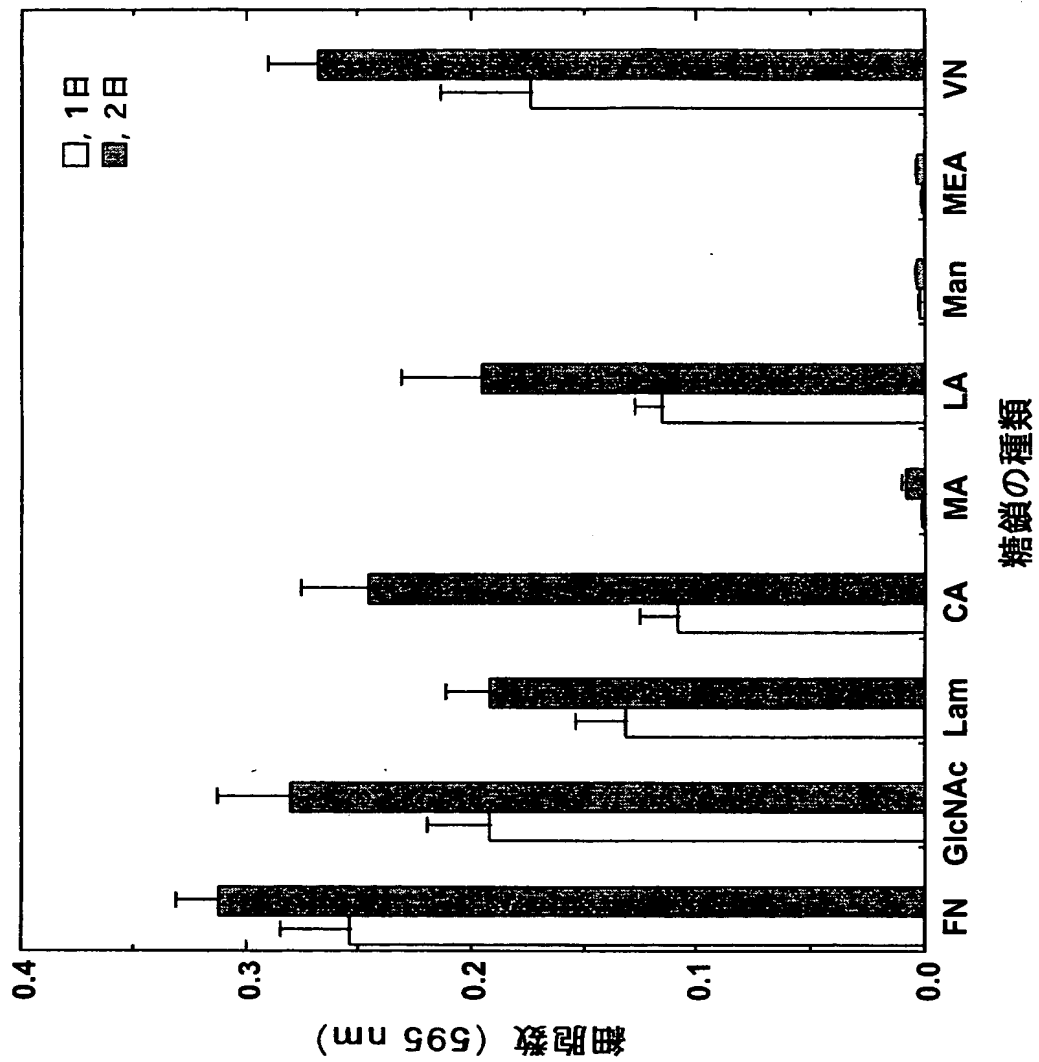
【図3】



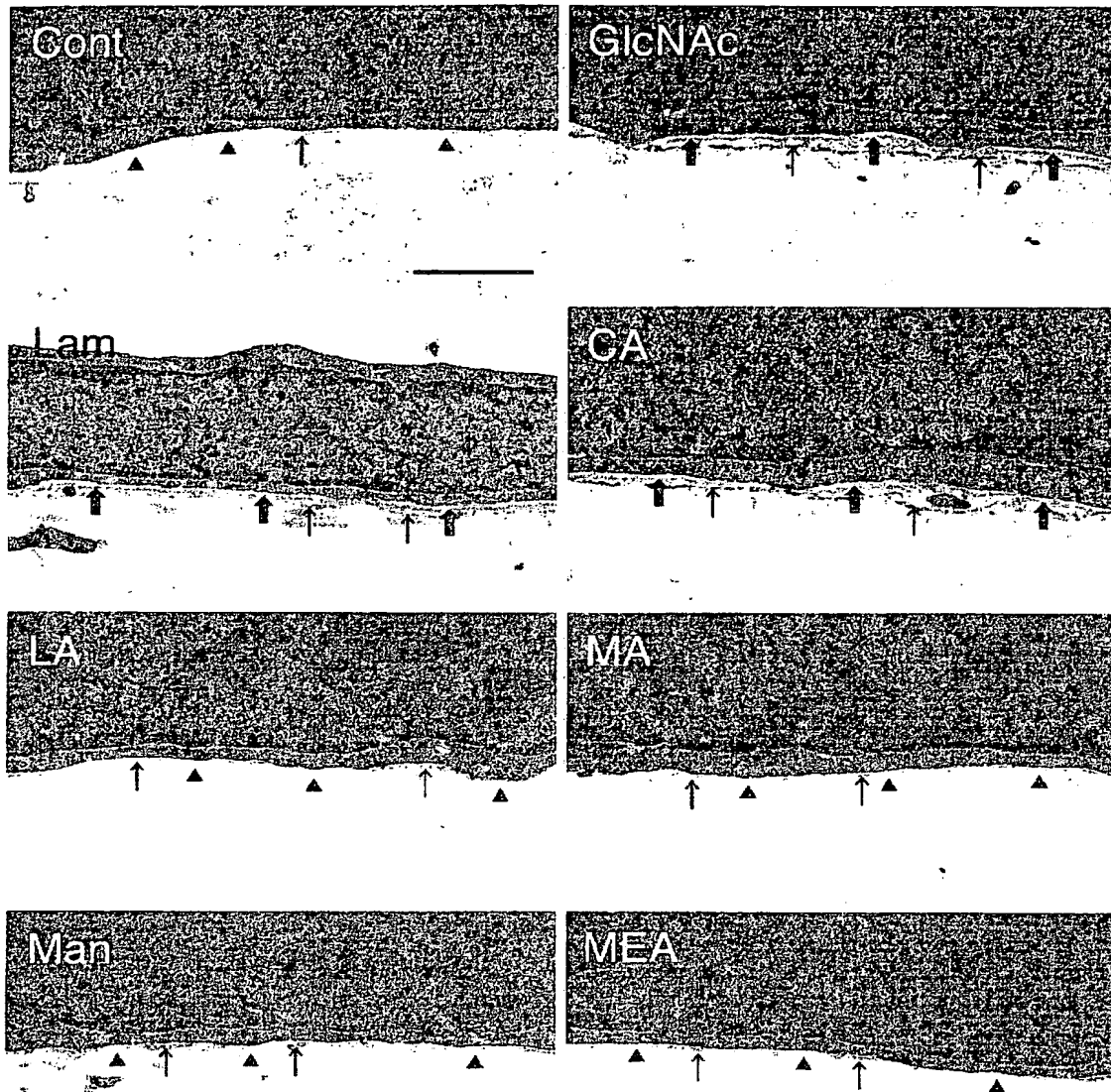
【図 4】



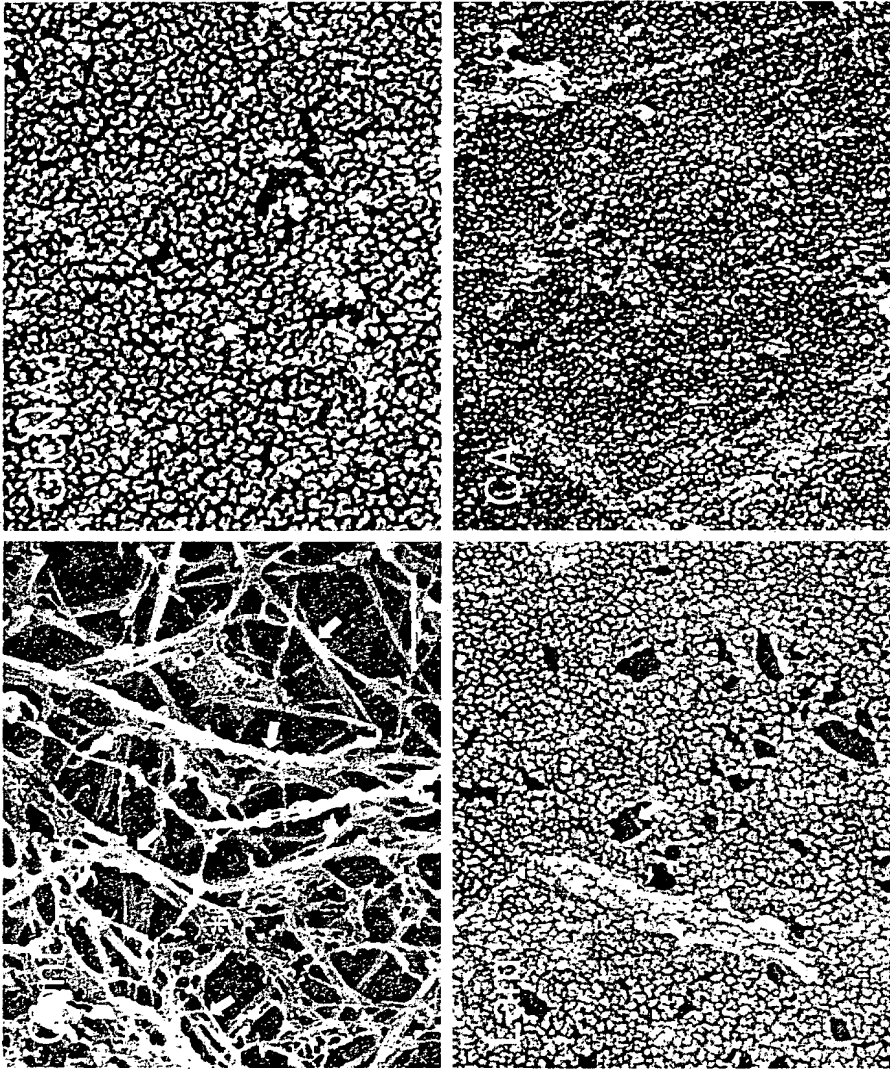
【図 5】



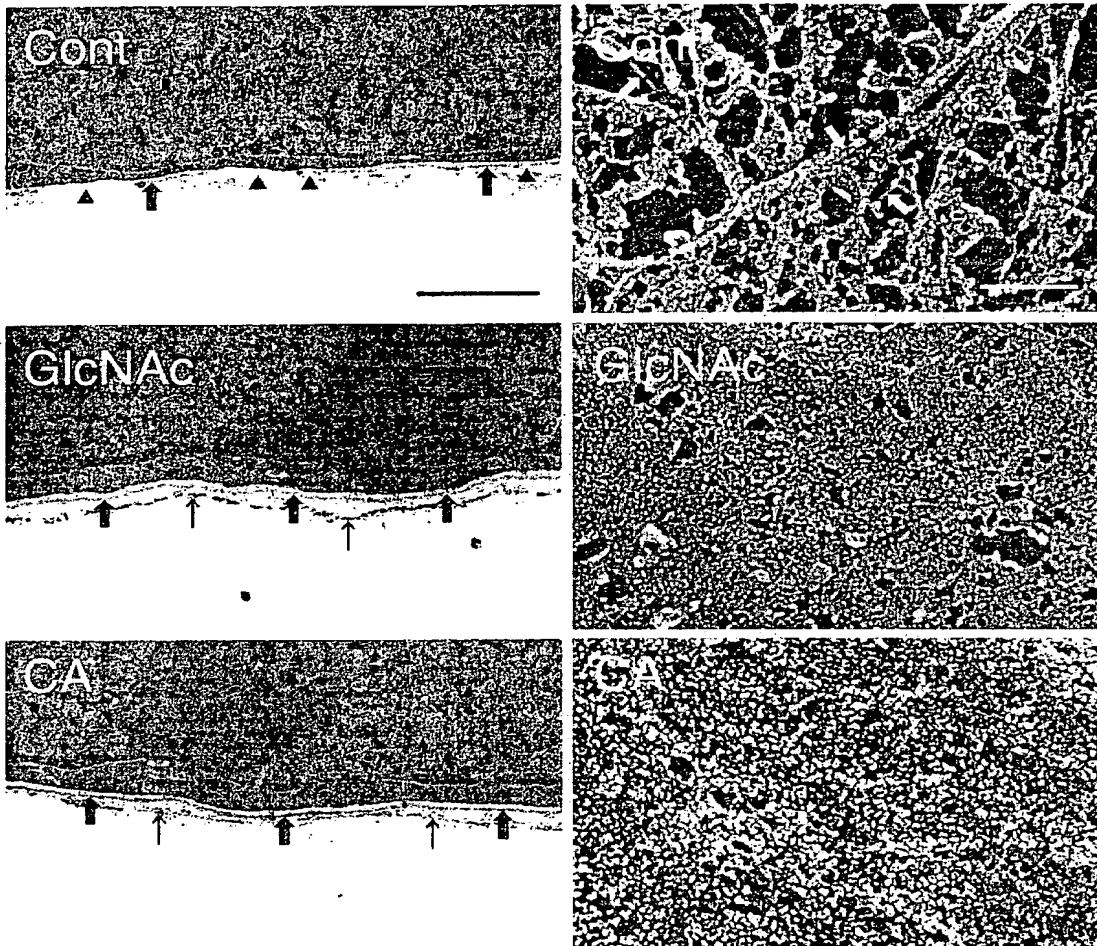
【図 6】



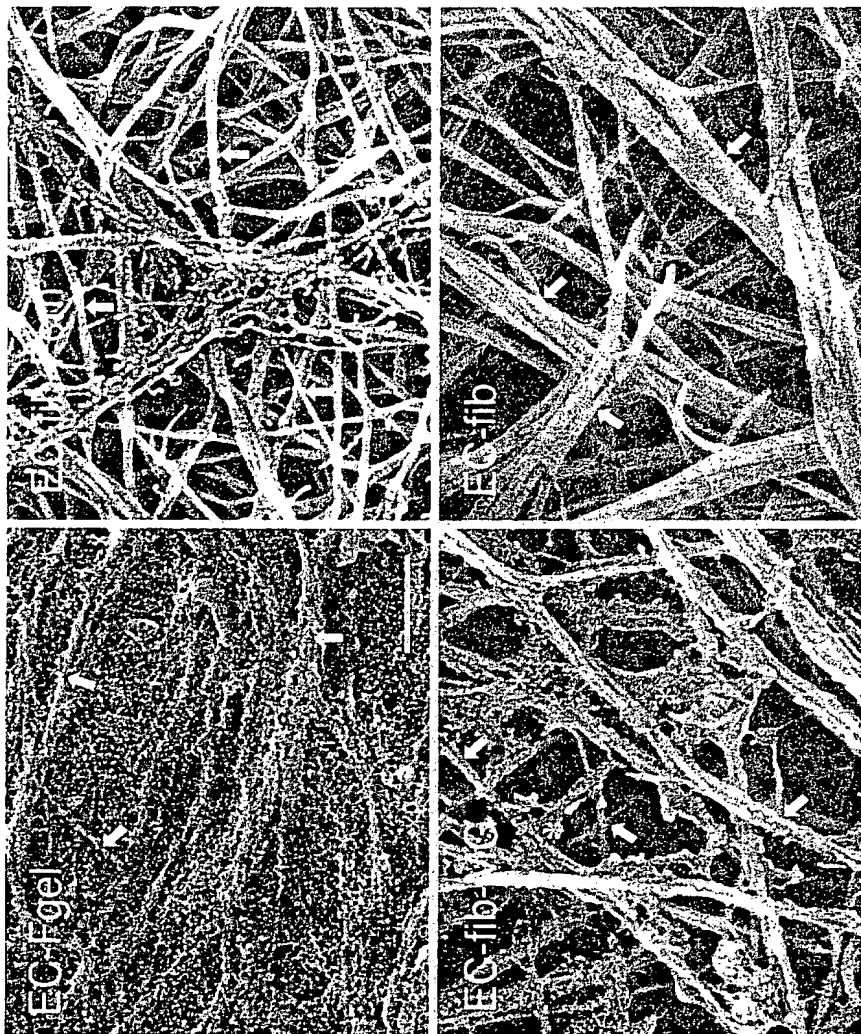
【図 7】



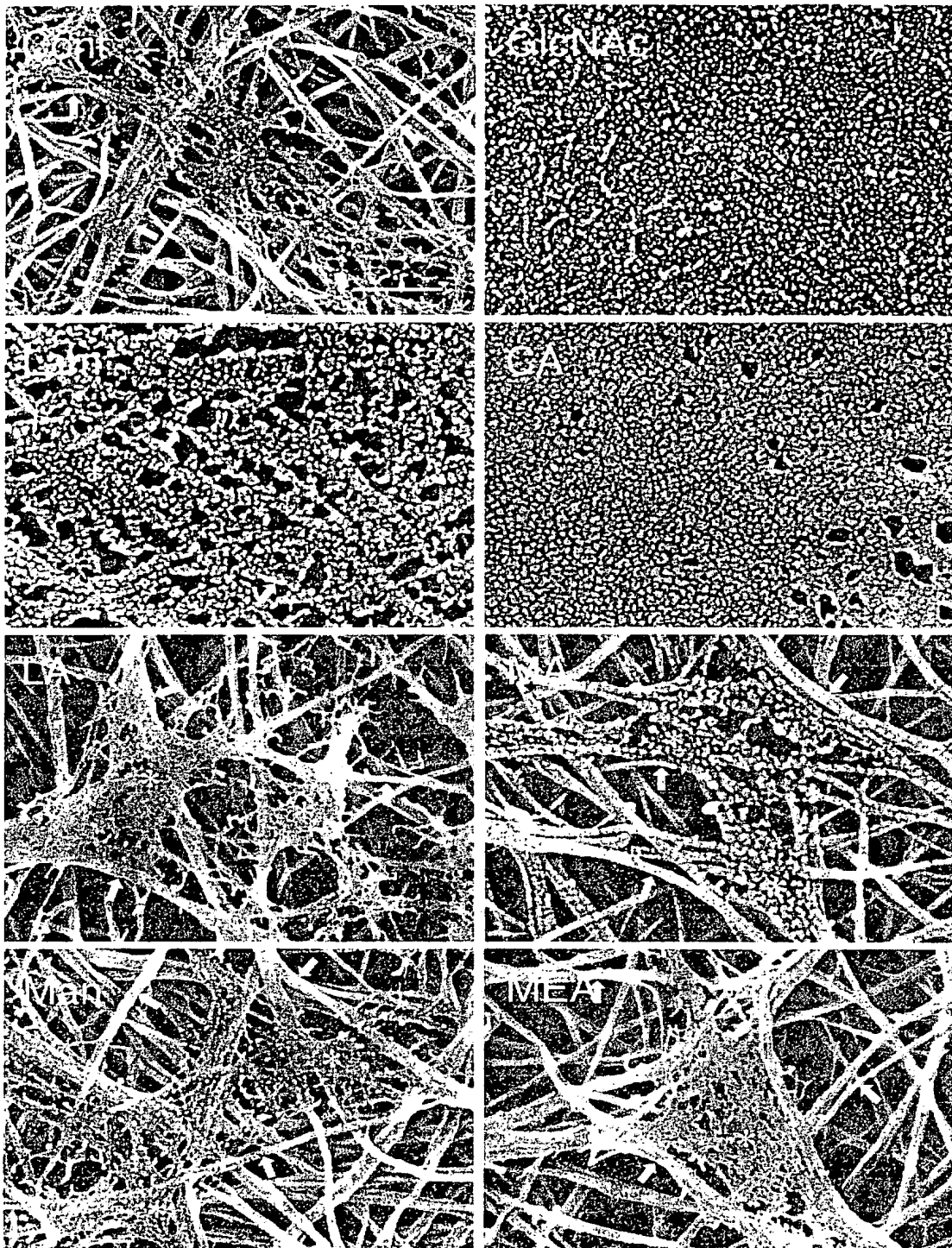
【図 8】



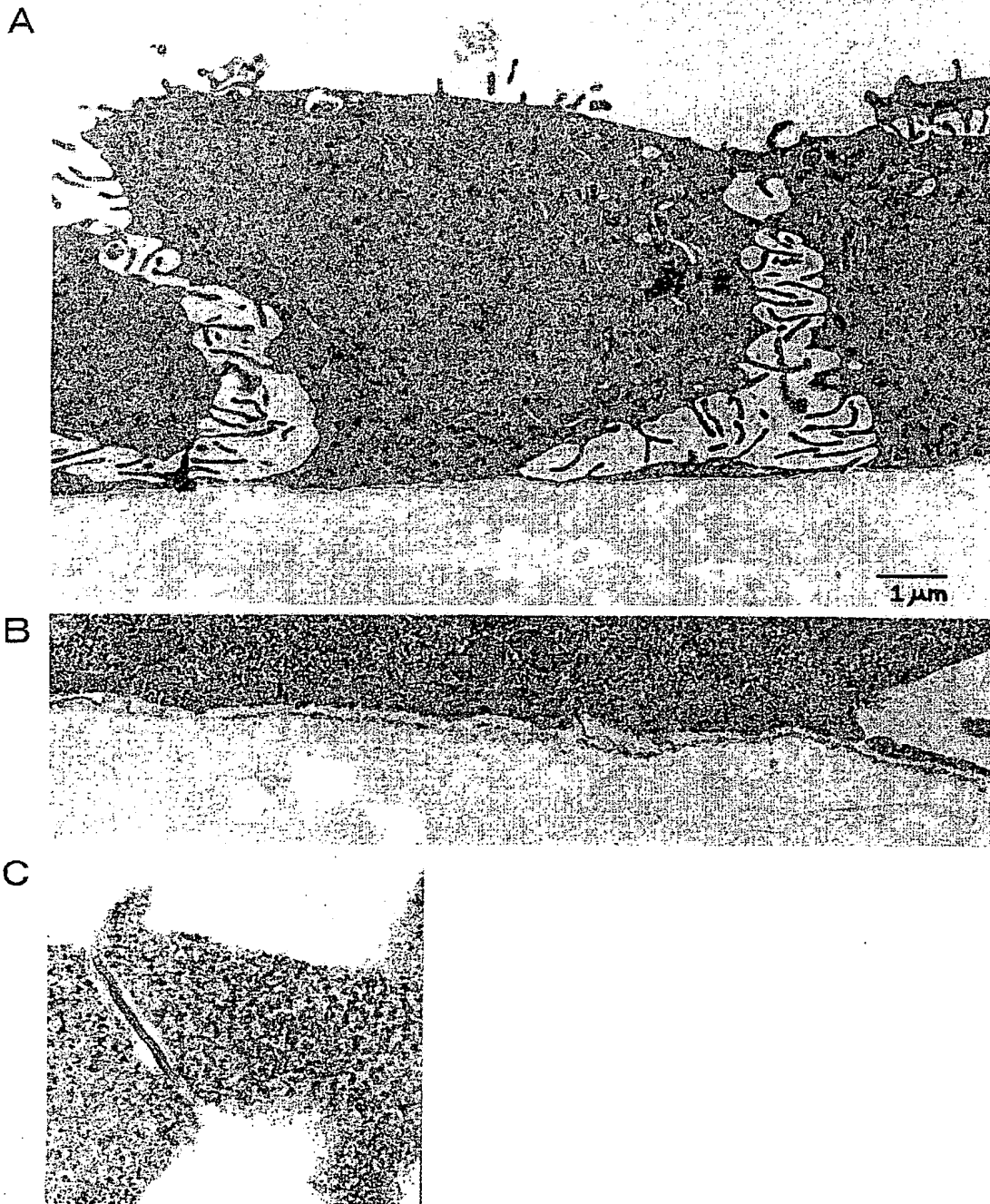
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基底膜形成能を有する同種又は異種の所定の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を提供すること。

【解決手段】 基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、0.1%トリトンX-100で処理し、細胞の脂質成分を溶解し、次いで、または同時に、50mMのNH₃と蛋白分解酵素阻害剤の混合液を用いて細胞の基底膜表面に残存する蛋白質を溶解するとともに、細胞が溶解する際に遊離してくるリソゾーム中の蛋白分解酵素等の内因性プロテアーゼ活性による基底膜の分解を抑制し、基底膜形成能を有する同種又は異種の所望の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を短時間に得る。

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成15年 4月25日
【整理番号】 12-471
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2001-292676
【承継人】
 【持分】 010/100
 【識別番号】 501273886
 【氏名又は名称】 独立行政法人国立環境研究所
 【代表者】 合志 陽一
【承継人代理人】
 【識別番号】 100107984
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 廣田 雅紀
【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-292676
受付番号	50300698985
書類名	出願人名義変更届
担当官	小池 光憲 6999
作成日	平成 15 年 6 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【承継人】

【識別番号】	501273886
【住所又は居所】	茨城県つくば市小野川 16-2
【氏名又は名称】	独立行政法人国立環境研究所

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2001-292676
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 2 7 3 8 8 6]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 7 月 1 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市小野川 1 6 - 2
氏 名	独立行政法人国立環境研究所

特願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.